

神経変性疾患と軸索内ミトコンドリア分布の関係性の解明

研究代表者：三宅 誠司（医学系部門・助教）、小西 慶幸（工学系部門・准教授）
共同研究者：辻 隆宏（医学系部門・助教）

概 要
軸索内のミトコンドリアの輸送異常は、局所的なエネルギー欠乏や異常ミトコンドリアの蓄積を介して様々な神経変性疾患の原因になると考えられる。網膜神経節細胞の変性を伴う緑内障においても以前よりミトコンドリア機能の異常や軸索輸送の異常との関連が報告されている。軸索内の異常は眼圧の上昇など細胞外の要因によって生じると考えられるが、その詳細な機構は明らかにされていない。この点を明らかにすることは、病態モデルの構築や診断法の確立などへ貢献すると考えられる。本研究では、緑内障に関係するとされるサイトカインである TNF- α および酸化ストレス因子について軸索内のミトコンドリアの輸送における影響を解析した。その結果、これらの因子が移動型ミトコンドリアの割合を低下させることが示された。さらに、生体内のミトコンドリアイメージングの系についても検討を進めた。
関連キーワード
神経、ミトコンドリア、軸索輸送、神経変性疾患、緑内障

研究の背景および目的

軸索内のミトコンドリアの軸索輸送は細胞内の ATP の供給やミトコンドリアの品質管理において重要な役割を担っている。また軸索内で一定の割合のミトコンドリアが微小管に係留を介して停止する必要がある。このような調節システムの破綻は、様々な神経変性疾患の原因となると考えられる。緑内障は網膜神経節細胞死や軸索の変性を伴う視神経疾患であり、日本においては中途失明の原因の1位の疾患である。他の神経変性疾患と同様に、網膜神経節細胞の変性の過程でミトコンドリアの軸索輸送の低下を伴うことが報告されているが、病態の進行には眼圧の上昇や細胞内在的な要因が複雑に関わっており、その機序は十分に解明されていない。そのため、早期の診断が難しいことや治療法が限られているなどの問題がある。

これまでに三宅らは、軸索輸送動態から神経細胞の細胞死を予測するために、軸索内のミトコンドリアに着目し、神経細胞が細胞死に至る過程における軸索輸送動態を評価してきた。小西らは、軸索内で停止したミトコンドリアに着目し、動態や分布の規則性があることを見出し、その機構の

解析を行ってきた。本研究は軸索内のミトコンドリアの動態を解析することで、緑内障をはじめとする神経疾患の病態モデルの構築や診断法の確立など臨床応用への貢献を目指すものである。

本年度は、緑内障に関連する病理的条件における軸索内のミトコンドリアの振る舞いについて中心的に解析を行った。さらに、生体における解析を非侵襲的かつ経時的に観察するための実験系の構築を進めた。特に緑内障に関連した主要な因子として、サイトカイン、酸化ストレス、グルタミン酸などが挙げられる。TNF- α は tBID を介してアポトーシスを誘導する一方、NF κ B を介した生存やオートファジーの経路も活性化する。緑内障ではアストロサイトにおける TNF- α の発現上昇が報告されている。一方、SNIP 解析による緑内障と thioredoxin reductase 2 との関連や、緑内障においてアストロサイトにおける NOS2 の発現上昇が報告されるなど酸化ストレスも病態の進行に関わると考えられているため、これらの因子がミトコンドリアの軸索輸送にどのように影響を与えるかについて、解析を行なった。

研究の内容および成果

1. 病理的条件におけるミトコンドリアの動態解析

初代培養神経細胞を用いたイメージングにより病理的条件における軸索内のミトコンドリアの動態を解析した。単離した網膜神経節細胞を 000.1-1.0 μ g/ml の TNF- α で処理し、ミトコンドリアの動態を解析した。その結果、1.0 μ g/ml の TNF- α 存在下で2時間後の移動性のミトコンドリアの割合が優位に減少した。これに対し、リソソ

ームなどの酸性顆粒の軸索輸送には影響が見られなかった。同様に 50 μ M の H₂O₂ の処理で 6h-12h にかけて移動性ミトコンドリアが減少する傾向が観察された。さらに、小脳顆粒細胞を用いた実験で 500 μ M のニトロ化チロシン投与により、移動性ミトコンドリアの割合が優位に低下することが観察された。

これまでの報告で海馬錐体細胞を用いた実験で

H₂O₂がp38を介してミトコンドリアの軸索輸送を阻害すること、p38がTNF- α の下流でも活性化されることが知られている。さらに緑内障ではp38の活性化が起こることが報告されている。網膜神経節細胞においてTNF- α とH₂O₂が共に移動型ミトコンドリアを低下させたことから、p38を介したミトコンドリア輸送の調節機構が緑内障におけるミトコンドリア輸送の低下に関わる可能性が考えられる。tBID、NF κ Bなど他の経路の関与も考えられ、今後の研究により分子機構が明らかにされることが期待される。一方、ニトロ化チロシンは微小管を構成する α チューブリンのC末端に取り込まれることから、上記の機構とは異なり、微小管に作用することでミトコンドリアの輸送を阻害すると考えられる。SNIP解析で緑内障との関連が報告されているGAS7は微小管の伸長を制御することから、複数の経路を介してミトコンドリアの停止が起こる可能性が示唆される。

2. 生体におけるミトコンドリアイメージング

前述の解析は、分散培養した神経細胞を用いているため、実際の神経変性疾患の病態と必ずしも一致しない点が存在する。そこでThy1プロモーター下流でmito-YFPを発現するトランスジェニックマウスを作製し、動物用の眼底カメラを用いたミトコンドリアのライブイメージングによる解析を試みた。臨床においても眼底カメラは使用されることから、将来的に緑内障診断への応用に繋がると考えている。

図1はThy1-mito-YFPマウスの眼底カメラ像である。解像度の問題から移動型ミトコンドリアの追跡は困難であったが、軸索上の停止型ミトコンドリアの位置は解析可能であることが示された。今後、培養下での知見と動物を用いたモデルの比較に用いることができると考えられる。この他、小脳内のミトコンドリア分布の解析や二光子顕微鏡の利用についても進めている。

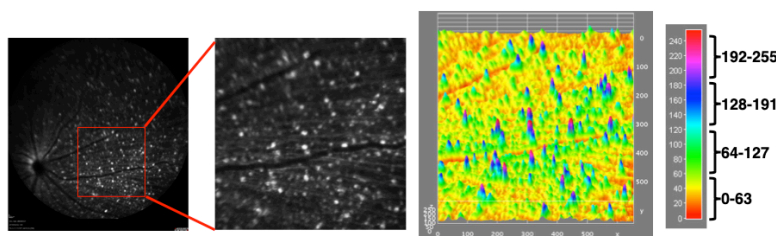


図1. 眼底カメラを用いたThy1-mito-YFPトランスジェニックマウス網膜のイメージング軸索内のミトコンドリアの空間的分布。網膜神経節細胞の細胞体および軸索におけるシグナルが検出された。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

Effect of 0.05% Difluprednate Ophthalmic Emulsion on Proinflammatory Cytokine Levels After Retinal Laser Photocoagulation in Rabbits. Kakimoto H, Takamura Y, Arimura S, Miyake S, Matsumura T, Gozawa M, Iwasaki K, Morioka M, Yamada Y, Inatani M. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 34:410-415, 2018.

Inami Y, Omura M, Kubota K, Konishi Y. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 reduces extension of the axonal leading process by destabilizing microtubules in cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1690:51-60, 2018.

Konishi Y, Matsumoto N, Hori I, Imanaka C, Miyake S. Region dependent regulatory mechanisms for the maintenance of axonal arbor structure. 12th International Symposium on Nanomedicine. Dec6-8 2018 Ube (招待講演).

Y Konishi. Intracellular molecular systems regulating the branched axonal structure. Basic and Translational Research for Brain Disease Symposium. Dec 4-5, 2018, Beijing (招待講演).

堀生実, 松本望, 三宅誠司, 小西慶幸. 軸索内におけるミトコンドリアとプレシナプスの分布規則性.

第7回日本バイオマテリアル学会北陸信越ブロック若手研究発表会. 12/11 2018 福井市.

松本望, 堀生実, 三宅誠司, 小西慶幸. 軸索内におけるミトコンドリアの一様の分布の制御. 第41回日本分子生物学会年会. 11/28-30 2018 横浜.

堀生実, 松本望, 三宅誠司, 小西慶幸. 軸索内におけるミトコンドリアの分布規則性. 第61回日本神経化学学会大会・第40回日本生物学的精神医学会 9/6-8 2018 神戸.

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」
文部科学省科学研究費・若手研究 (B) 2016-2018年度・網膜神経節細胞のミトコンドリア動態と細胞死誘導機構の相関性解明とその臨床応用・代表 (三宅)・採択

2018年度ノバルティス研究助成・圧勾配を起点とした緑内障性視神経症の発症メカニズムの解明・代表 (三宅)・採択

戦略的創造研究推進事業・さきがけ・2018-2021年度・細胞内空間的配置の光操作による軸索形態制御の研究・代表 (小西)・不採択

文部科学省科学研究費・新学術領域研究・2019-2020年度・軸索終末の配置を調節する細胞自律的スクラップ&ビルド・代表 (小西)・申請中